

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی



پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

غربالگری گونه‌های مختلف آسپرژیلوس تولید کننده کوجیک اسید و
افزایش بازده به روش جهش‌زایی با نور فرابنفش

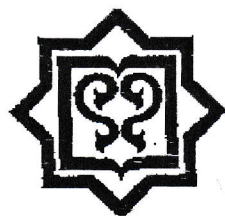
توسط:

رویا غضنفریان

اساتید راهنما:

دکتر مجتبی شکیبائی

دکتر حمید فروتن فر



School of Pharmacy

Kerman University of Medical Sciences



For the certificate of Pharm. D Degree

Title :

Screening of different kojic acid producing *Aspergillus* sp. and

Increasing the efficiency by Ultra Violet mutagenesis

By :

Roya Ghazanfarian

Supervisors :

Dr. Mojtaba Shakibaie

Dr. Hamid Forootanfar

Thesis No : 780

Summer 2014

خلاصه

کوجیک اسید یک اسید آلی می باشد و نام آن از لغت کوچی گرفته شده است که در مواد غذایی شرقی به عنوان یک مایع تلقیح قارچی مورد استفاده قرار می گیرد. این ترکیب می تواند آنزیم تیروزیناز را مهار کند و کاربردهای آن در صنایع آرایشی و بهداشتی، صنایع غذایی، صنایع شیمیایی و کشاورزی می باشد. کوجیک اسید در مقیاس صنعتی عمدتاً با استفاده از روش های بیولوژیک و از محیط کشت دو خانواده اسپرژیلوس و پنی سیلیوم بدست می آید.

در تحقیق حاضر در گام نخست از بین سویه های قارچی جنس اسپرژیلوس سویه ای که توانایی تولید کوجیک اسید را در محیط کشت دارد غربالگری شد. به این منظور سویه های مختلف اسپرژیلوس از جمله *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus* در محیط کشت Czapek-Dox (30 °C, 150 rpm) کشت داده شدند و سوپرناتانت محیط کشت برای تعیین مقدار کوجیک اسید با استفاده از روش اسپکتروفتومتری Bentley مورد استفاده قرار گرفت. سپس اسپور قارچ تولید کننده کوجیک اسید در مجاورت لامپ تولید کننده اشعه فرابنفش با طول موج ۲۵۵ نانومتر و در زمان های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، و ۴۰ دقیقه قرار گرفت. موتانت برتر از نظر مقدار تولید کوجیک اسید با روش میکرو پلیت جداسازی شد. همچنین مشخص گردید موتانت برتر (C5-10) در سیزده روز بعد از شروع کشت و در شرایط کشت ساکن بیشترین مقدار کوجیک اسید را تولید میکند. برای اثبات کیفی تولید کوجیک اسید، با استفاده از روش استخراج با حلال از محیط کشت کوجیک اسید جداسازی شد و طیف IR آن با کوجیک اسید استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت. در مرحله آخر با استفاده از روش طراحی آزمایش Fractional factorial اجزاء محیط کشت که بیشترین تأثیر را در تولید کوجیک اسید توسط موتانت برتر داشتند، غربالگری شدند. به این ترتیب مشخص

شد که گلوکز، عصاره مخمر، دی هیدروژن پتاسیم فسفات و آمونیوم سولفات ترکیباتی هستند که بیشترین تأثیر را در تولید کوچیک اسید دارند و میتوان با تنظیم مقدار آنها در محیط کشت به مقدار بیشینه تولید کوچیک اسید توسط موتانت دست پیدا کرد.

کلمات کلیدی: غربالگری، سویه‌های آسپرژیلوس، کوچیک اسید، موتاسیون‌زایی با اشعه فرابنفش،

طراحی آزمایش

Abstract

Kojic acid is an organic acid. Its name, 'kojic acid' (which was, originally, known as Koji acid) was derived from "Koji", the fungus starter or inoculum used in oriental food fermentations for many centuries.

Kojic acid has various applications in several different fields. It is widely used in cosmetic, food industries, medicine, agriculture and chemical industries.

In this research, at first the strains of *Aspergillus* which have ability to produce kojic acid were screened. To achieve this purpose, different fungal strains such as *A. flavus* (PTCC 5004), *A. fumigatus* (PTCC 5009), *A. terreus* (PTCC 5283), *A. niger* (PTCC 5012) and *A. oryzae* (PTCC 5163) were aerobically cultured in Czapek-Dox media (30 °C, 150 rpm). The supernatant of culture media was used for the presence of kojic acid estimation according to Bentley's colorimetric method in different time intervals.

Spores from the best kojic acid producer were subjected to UV light (255 nm) for different periods of time (5, 10, 20, and 40 min). The best mutant was selected in 96-well plates after incubating for 2 days, followed by addition of 10 µl of ferric chloride (1%). Elevated amounts of kojic acid produced by the mutant were confirmed by shaking flask fermentation.

Finally, fractional factorial design was used to specify effective medium components on production of kojic acid. Results suggest that glucose, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate and ammonium sulfate are the compounds that influence greatly on kojic acid production. By adjusting the amount of mentioned factors in culture medium, maximum amounts of kojic acid can be produced by mutant.

Key Words: Screening, *Aspergillus* sp., Kojic acid, Ultra violet mutagenesis, experimental design.